

Die Wirkung von Vitamin E und Vitamin K in der oxydativen Phosphorylierung

Untersuchungen am isolierten Froschherzen

von

PETER DOHRN

us dem Physiolog.-chem. Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. A. Butenandt

Die Wirkung von Vitamin E und Vitamin K
in der oxydativen Phosphorylierung

Untersuchungen am isolierten Froschherzen



Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Peter Dohrn
aus
Bad Wiessee

1959

Referent: Prof. Dr. Niemer
Korreferent: Prof. Dr. Butenandt
Dekan: Prof. Dr. Kolle
Tag der mündlichen Prüfung: 16.7.1959

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

Teil I

Seite

A. Chemie und Stoffwechsel der Vitamine E u. K	
1. Vitamin E	1
Chemie	1
Vorkommen und Gehalt	4
Physiologische Wirkung u. Mangelercheinungen	5
2. Vitamin K	7
Chemie	7
Vorkommen und Gehalt	9
Physiologische Wirkung	10
B. Die Wirkung der Vitamine E. u. K in der oxy-	
dativen Phosphorylierung	
1. Atmungskette u. Phosphorylierung	10
2. Vitamin K u. oxydative Phosphorylierung ...	14
3. Vitamin E u. oxydative Phosphorylierung ...	22

Teil II

Eigene Untersuchungen am isolierten Froschherzen

A. Methodik	27
Präparation	27
Statistische Auswertung	29
Verbindungen und Lösungen	30
B. Ergebnisse	32
1. Fructose	
2. Tocopherol	
3. Phyllochinon	
4. ATP	
5. Menadion	
6. Hemmstoffe	
Signifikanz der Ergebnisse	35
Pharmakologische Wirkung	35
C. Diskussion	36
Zusammenfassung	40
Literaturverzeichnis	41
Lebenslauf	

E i n l e i t u n g

In den letzten Jahren haben die beiden fettlöslichen Vitamine E und K, bisher als Antisterilitätsvitamin und antihämorrhagisches Vitamin bekannt, auch von biochemischer Seite wachsendes Interesse erfahren, nachdem man annimmt, daß diese Wirkungen im Organismus Ausdruck einer viel allgemeineren Funktion dieser Vitamine in Grundvorgängen des Energiestoffwechsels sind. Es konnten eine Reihe von Befunden erhoben werden, die eine solche Rolle wahrscheinlich machen.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, im ersten Teil einen allgemeinen Überblick über den derzeitigen Stand der Untersuchungen hinsichtlich der Wirkungsweise der Vitamine E und K im Muskelstoffwechsel und die daran geknüpften theoretischen Überlegungen über eine Wirkung in der oxydativen Phosphorylierung zu geben. Im zweiten Teil soll die Darstellung eigener Untersuchungen über die Wirkung dieser Vitamine am isolierten und ermüdeten Froschherzen erfolgen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555215_0008

Zunächst sollen die beiden Vitamine in ihrem chemischen und physiologischen Verhalten umrissen werden, soweit dies mit dem Gegenstand dieser Untersuchungen in Zusammenhang steht.

Vitamin E

Evans entdeckte im Jahre 1922 bei Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Nahrungsbestandteile auf den Organismus einen Diätfaktor, bei dessen Fehlen Störungen der Fortpflanzungstätigkeit der Ratte auftraten. Dieser Stoff, der zuerst als Faktor X bezeichnet wurde, erhielt dann später die Bezeichnung Vitamin E oder Antisterilitätsvitamin. Die Existenz dieses Vitamins wurde aber erst allgemein anerkannt, als es Evans und Burr 1926 gelang, eine Methode zum biologischen Nachweis auszuarbeiten und mit deren Hilfe Einblick in seine Wirkungsweise zu gewinnen.

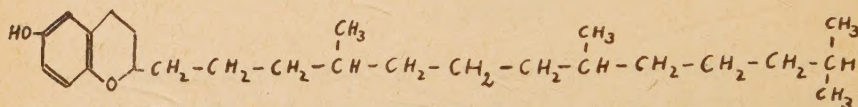
1928 beobachteten Evans und Burr das Auftreten von Lähmungen und Nerven-Muskelschädigungen bei jungen vitamin-E-frei ernährten Ratten. Damit war erwiesen, dass das Antisterilitätsvitamin auch extragenitale Angriffspunkte im Organismus hatte. Sowohl die 1931 von Goetsch und Pappenheimer entdeckte aber zunächst in ihrem Wesen nicht erkannte "alimentäre Muskeldystrophie" als auch die von Mackenzie und Mac Collum beschriebene altersbedingte Muskeldystrophie konnte 1939 auf einen Vitamin E-mangel zurückgeführt werden.

1936 konnte Evans aus Weizenkeimöl zwei chemisch einheitliche Substanzen isolieren, die im Antisterilitätstest volle E-Wirksamkeit besaßen. Die Konstitutionsermittlung und Synthese war das Ergebnis gleichzeitiger Arbeiten verschiedener Arbeitskreise.

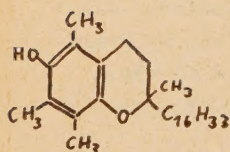
Chemie

In der Natur waren bisher 4 und neuerdings noch 3 weitere vitamin-E-wirksame Stoffe bekannt, die sich nur durch die ver-

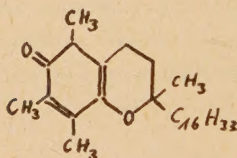
schiedene Stellung gewisser Substituenten unterscheiden und Derivate des Chromans darstellen. Sie lassen sich von einem in der Natur nicht vorkommenden Grundkörper, dem Tokol, ableiten und werden als $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta, \eta$ -Tocopherole bezeichnet.



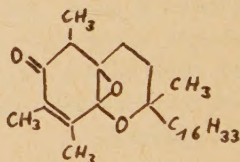
Tokol



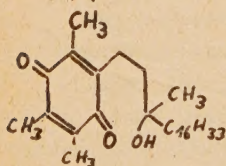
α -Tocopherol



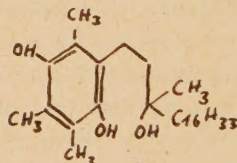
Tocopheryl-semichinon



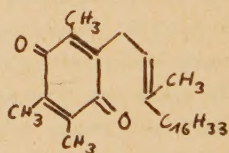
Tocopheraloxyl



Tocopheryl-chinon



Tocopheryl-hydrochinon



Phytol-trimethylbenzoquinon

Tocopherol und einige wichtige Oxydationsprodukte

Die Tocopherole sind in reiner Form blaß-gelbliche Öle mit einem charakteristischen Absorptionsspektrum im UV bei 295 - 298 m μ . Sie lösen sich in allen Fettlösungsmitteln, wie Äther, Chloroform, Petroläther u.a., dagegen nicht in Wasser. Sie sind relativ stabil, sind jedoch in fein verteilter oder kolloidal gelöster Form oder in Gegenwart katalytisch

wirksamer Schwermetalle empfindlich gegenüber Sauerstoff oder Oxydationsmitteln.

Durch Veresterung, z.B. mit Acetat, wird ihre Sauerstoffempfindlichkeit verringert ohne Einbusse an biologischer Wirksamkeit.

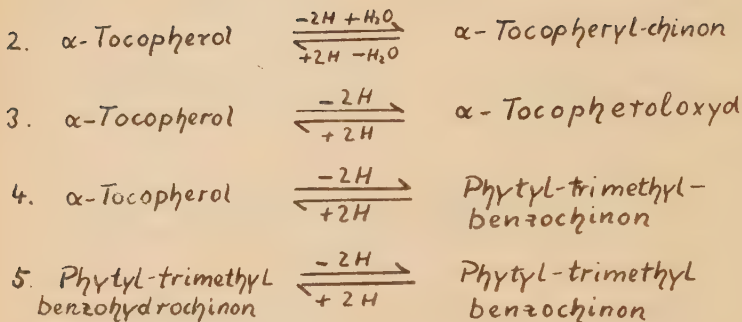
Auf Grund ihrer antioxydativen Eigenschaften werden die Tocopherole vielfach als Anti oxydantien in der Nahrungsmittelchemie verwendet.

Die Tocopherole sind vielfachen oxydativen Umwandlungen zugänglich. So konnten Michaelis und Wollmann (1) α -Tocopherol bei UV-Licht und -190° zu einem Produkt von Semichinoncharakter, dem Tocopherylsemichinon, oxydieren, das bei gewöhnlicher Temperatur instabil ist. und sich leicht in Tocopherol zurückverwandelt. Während dieses durch Abgabe eines einzelnen Elektrons entsteht, konnte Boyer (2) durch vorsichtige Oxydation mit Eisen-III-chlorid aus α -Tocopherol in einem 2-Elektronenschritt ein weiteres reversibles Oxydationsprodukt, das Tocopheroloxyd, gewinnen, das relativ stabil ist und ebenfalls biologische Wirksamkeit besitzt. Es kann durch Dithionit oder Ascorbinsäure zu Tocopherol reduziert aber auch irreversibel zu Tocopherylchinon oxydiert werden.

Martius (3) hat in jüngster Zeit ein weiteres biologisches Oxydationsprodukt beschrieben, das wie das Tocopheroloxyd um 2 Wasserstoffatome ärmer ist, das sog. 5,7,8,-Trimethyl-6-hydroxy-Benzochinon, das mit Benzohydrochinon ein Redoxsystem bildet.

Es bieten sich also folgende Oxydations-Reduktionsysteme des Tocopherols an:





Auf Grund dieser Redox Eigenschaften ist es möglich, daß das Vitamin E als Bestandteil reversibel funktionierender biologischer Redoxsysteme, wie z.B. der Atmungskette wirken kann.

Vorkommen und Gehalt

Vitamin E ist im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet, scheint jedoch nicht ein integrierender Bestandteil jeder lebenden Zelle zu sein. Ein Vorkommen in Bakterien, Hefe, Pilzen oder Protozoen konnte jedenfalls bisher nicht nachgewiesen werden.

Besonders bedeutungsvoll im Zusammenhang mit der postulierten Rolle im Energiestoffwechsel ist der verhältnismäßig hohe Gehalt der Mitochondrien, des hauptsächlichsten Ortes der Zellatmung. So fand Slater (4) in einem Herzmuskelpräparat einen Vitamin E-gehalt von $1,1 \mu\text{M/g}$ Protein.

Søndergaard und Dam (5) konnten folgenden Vitamin E-Gehalt in Zellhomogenaten aus Lebern junger Küken feststellen:

Nuclearfraktion	$1,14 \mu\text{M/g}$	P. = 20%
Mitochondrienfraktion	$2,16 \mu\text{M/g}$	P. = 45%
Überstand	$1,60 \mu\text{M/g}$	P. = 33%

Zu beachten ist hier die relativ hohe Konzentration in der Mitochondrienfraktion.

Physiologische Wirkung und Mangelerscheinungen

Ähnlich wie auch die anderen Vitamine besitzt das Vitamin E eine allgemeine Wachstums- und Entwicklungs-fördernde Wirksamkeit.

Die Bedeutung des Vitamins als Antisterilitätsvitamin stand deshalb zunächst so im Vordergrund, weil die ersten Untersuchungen an Ratten durchgeführt wurden und bei diesen Tieren besonders früh Mangelsymptome hinsichtlich der Fortpflanzung in Erscheinung traten. Es zeigte sich jedoch später, dass sich diese Wirkung keineswegs auf das gesamte Tierreich erstreckt.

Wesentlich bedeutungsvoller ist die später festgestellte Wirkung auf den Muskelstoffwechsel. Goetsch und Pappenheimer (6) konnten nämlich feststellen, dass eine durch Vorbehandlung mit ätherischer Eisenchloridlösung von Vitamin E befreite Kost bei Kaninchen eine Muskeldystrophie hervorruft; doch wurde der Nachweis, dass es sich hierbei um ein spezifisches E-Mangelsymptom handelt, erst von Mackenzie und Mc Collum erbracht (7). Diese alimentäre Muskeldystrophie ist bei den Herbivoren das im Vordergrund stehende Symptom einer E-Avitaminose. In wie weit allerdings beim Menschen die Muskeldystrophie Ausdruck eines Vitamin-E-Mangels oder einer fehlgesteuerten Verwertung von E ist, ist nicht geklärt.

Victor (8) beobachtete schon 1934, daß der Verbrauch an Sauerstoff im dystrophischen Muskel erhöht ist. Diese Vermehrung des O_2 -Verbrauches konnte später an Muskelstreifen und Muskelschnitten vitamin-E-frei ernährter Ratten und Hamster (ebenso an Enten und Hühnern) sowie im Respirationsversuch an der E-Mangel-Ratte nachgewiesen werden. (Houchin-Matill, Friedman-Matill, Victor u.ä.) Andererseits konnte der O_2 -Verbrauch in vivo und in einzelnen Fällen in vitro durch Tocopherolgaben gesenkt werden. (Houchin-Matill, Hummel-Melville, Hummel-Basinsky u.ä.)

Weiterhin wurde festgestellt, dass die dystrophische Muskulatur E-avitaminotischer Tiere, die durch Oxydation der Kohlehydrate oder von Zwischenprodukten des Kohlehydratstoffwechsels freiwerdende Energie in Form von energiereichen Phosphatverbindungen (Adenosintriphosphat und Kreatininphosphat) ^{nicht} zu speichern vermag. (Hummel (9), Emerson-Evans, Boyer). Dies äussert sich auch in einer Abnahme des Gehaltes der Muskulatur an organisch-gebundenem Phosphor speziell an Kreatininphosphat, und einer entsprechenden Ausschwemmung von anorganischem Phosphat und Kreatin im Harn, was auf eine mangelnde Synthese von Kreatininphosphat und einen beschleunigten Zerfall zurückzuführen ist (Hummel (9).) Damit steht das lange bekannte Symptom der Kreatinurie bei der alimentären Dystrophie und deren Beseitigung mit Tocopherolgaben in Einklang.

Diese Befunde lassen sich leicht mit der Annahme erklären, dass das Vitamin E für den Vorgang der Atmungskettenphosphorylierung unentbehrlich ist, nachdem der diesen Vorgang kennzeichnende P/O-Quotient deutlich vermindert ist. Dafür spricht auch, dass der Anstieg des Sauerstoffverbrauches in der Leber avitaminotischer Tiere durch Pyrophosphat oder ATP in vitro wieder zur Norm herabgesetzt werden kann. (Weinstock, Milhorat und Goldrich (10)). Die Vermehrung des Sauerstoffverbrauches im E-mangeldystrophischen Muskel könnte man dann als Kompensationsvorgang deuten, um die Bereitstellung der unentbehrlichen Mindestmenge an energiereichem Phosphat trotz Behinderung der phosphorylierenden Mechanismen zu gewährleisten. Dies entspräche dem erhöhten O₂-Verbrauch bei der Entkopplung von Atmung und Phosphorylierung z.B. durch Thyroxin, wie sie Martius (s.später) vertritt. Es besteht damit eine gewisse antagonistische Wirkung von Vitamin E und Thyroxin, wofür auch die Beschleunigung des Tocopherolverbrauches durch Gaben von Thyroxin und die Entstehung von Vitamin E-Mangelerscheinungen, wie z.B. Kreatinurie nach Schilddrüsenverfütterung sprechen. (11). Die Kreatinurie kann durch Tocopherol beseitigt werden (Braunsteiner).

Neben diesen Wirkungen im Muskelstoffwechsel hat das Vitamin E noch Einflüsse auf vielfache Stoffwechselvorgänge, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann, die aber auf die allgemeine Bedeutung dieses Vitamins im Organismus hinweisen.

Vitamin K

Im Jahre 1926 fand Dam bei seinen Untersuchungen über den Cholesterinstoffwechsel an Hühnchen, dass diese bei der für diese Versuche notwendigen lipoidfreien Ernährung nach einigen Wochen Blutungen an der Haut und an den Schleimhäuten bekamen.

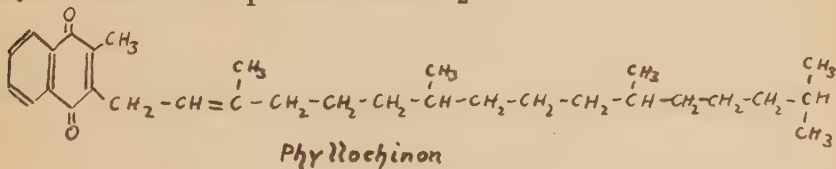
1935 konnten Dam und fast gleichzeitig Alquist nachweisen, dass diese Erscheinungen durch den Mangel eines bisher unbekannten, anscheinend für die Blutgerinnung notwendigen Diätfaktors hervorgerufen werden. Dieser Faktor erhielt die Bezeichnung "antihämorrhagisches Vitamin" oder Vitamin K.

1939 gelang es fast gleichzeitig Karrer, Fieser und Doisy, dieses Vitamin darzustellen, seine Konstitution aufzuklären und Verbindungen mit Vitamin-K-Wirksamkeit zu synthetisieren.

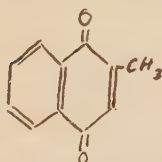
Etwa zur selben Zeit stellte sich heraus, dass natürliche und synthetische, dem Vitamin K chemisch ähnliche Verbindungen vom Typ des Dicumarols als K-Antagonisten wirken und die Blutgerinnung verhindern können.

Chemie.

Das Vitamin K kommt in der Natur in zwei Formen vor: Phyllochinon (Vit. K₁) und Vitamin K₂.



K₁ und K₂ leiten sich vom 2-Methyl-1,4-naphthochinon, dem sog. Menadion, ab, das ebenfalls biologische Wirksamkeit besitzt.



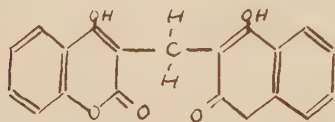
Menadion

Das Phyllochinon ist in Wasser unlöslich, in Alkohol schwer löslich, dagegen löst es sich leicht in Fetten und Lipoidlösungsmitteln. Es ist empfindlich gegen Alkali, Licht und Hitzeeinwirkung und wird durch Reduktion mit Zink und Essigsäure in Hydrochinon verwandelt.

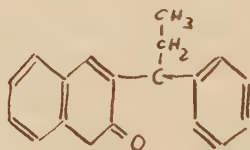
Das Absorptionsspektrum weist Maxima bei 243, 248, 262, 270 und 328 m μ auf.

Gewisse Strukturveränderungen, wie Ersatz des Naphthochinonringes durch einen Cumarinring und der Methylgruppe durch ein weiteres Ringsystem führen zu ausgesprochenen "Antivitamin-K"-Eigenschaften. Dieser Antivitamineneffekt kann sich in einer antibiotischen, wachstumshemmenden Wirkung oder spezifisch in einer gerinnungshemmenden Wirkung äussern.

Die beiden wichtigsten Verbindungen dieser Art sind Dicumarol und Marcumar, die als Antikoagulantien in der Medizin eine erhebliche Rolle spielen.

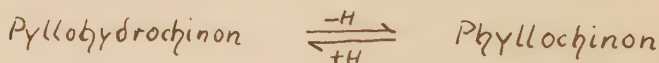


Dicumarol



Marcumar

Ebenso wie das Vitamin E kann auch Vit. K durch verhältnismässig leichte Reduzierbarkeit zum entsprechenden Hydrochinon als Bestandteil eines biologischen Redoxsystems wirken.



Vorkommen und Gehalt

Vitamin K ist in allen Lebewesen von der primitivsten bis zur höchsten Stufe der Organisation nachweisbar. So bilden und enthalten Bakterien grosse Mengen von Vitamin K (meist K_2). Der Vitaminbedarf des Säugetieres wird weitgehend durch die Produktion der Darmflora gedeckt, während der Vogel auf die Zufuhr mit der Nahrung angewiesen ist. Deshalb können Kücken bis zum Auftreten von hämorrhagischen Erscheinungen K-frei aufgezogen und zu Versuchszwecken benutzt werden.

Martius konnte in den Zellfraktionen verschiedener Organe, wie Herz, Leber und Niere folgenden Gehalt an Vit. K feststellen (12):

Herzgewebe:	Gehalt in der M-Fraktion	0,86 μM /	g N
	" " " K-Fraktion	0,15 μM /	g N
Lebergewebe:	Gehalt in der M-Fraktion	0,11 μM /	g N
	" " " K-Fraktion	0,05 μM /	g N
Nierengewebe:	Gehalt in der M-Fraktion	0,07 μM /	g N
	" " " K-Fraktion	0,01 μM /	g N

M-Fraktion = Mitochondrienfraktion
K-Fraktion = Kernfraktion

Bedeutungsvoll ist hierbei der relativ hohe Gehalt der Mitochondrienfraktionen gegenüber den anderen Zellfraktionen und weiterhin der wesentlich höhere Gehalt des Herzgewebes gegenüber anderen Geweben.

Green, Söndergaard und Dam (13) fanden in Präparaten aus Rindsleber einen ähnlichen Vitamin-K-Gehalt und eine ähnliche Verteilung auf Mitochondrien, Kerne und andere Zellbestandteile wie Martius.

Erhebliche Mengen an Vitamin K kommen auch in den grünen Pflanzenteilen vor, und zwar vor allem in den Chloroplasten, wo es

mit dem Chlorophyll in biologischem Zusammenhang zu stehen scheint. (33)

Physiologische Wirkung

Auf die vielfachen Wirkungen des Vitamins K im Organismus braucht hier nicht näher eingegangen zu werden. Abgesehen von seiner fördernden Wirkung auf den Gerinnungsmechanismus, wo es bei der Prothrombin- und Faktor VII-Synthese massgeblich beteiligt ist, kommt dem Vitamin K ebenso wie dem Vitamin E eine allgemeine Wachstums- und entwicklungsfördernde Wirkung zu. Dieser Wachstumseffekt sowie auch die Rolle bei der Blutgerinnung scheinen jedoch nur Ausdruck einer ganz allgemeinen Funktion dieses Wirkstoffes im Zellstoffwechsel, und zwar ebenso wie dies für das Vitamin E gefordert wird, in der oxydativen Phosphorylierung zu sein.

Bevor diese Funktion der beiden fettlöslichen Vitamine diskutiert wird, soll noch in kurzen Umrissen auf Vorgänge der Atmungskettenphosphorylierung eingegangen werden, soweit sie mit der postulierten Wirkung von E und K in Zusammenhang stehen.

Atmungskette und Phosphorylierung

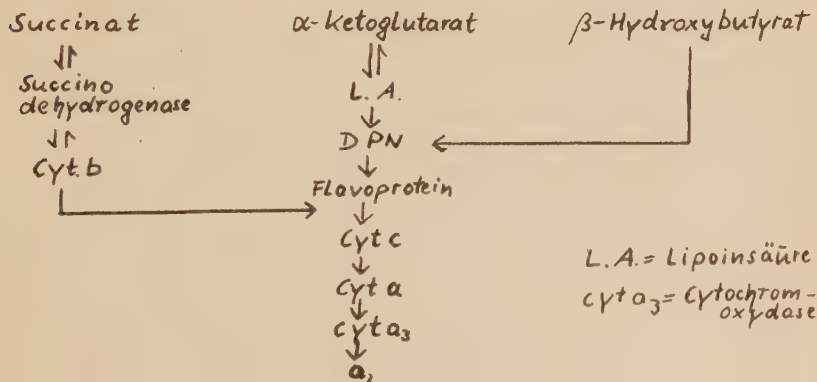
Jede lebende Zelle ist auf ständige Zufuhr von Energie angewiesen.

Der tierische Organismus gewinnt diese Energie durch Umwandlung von energiereichen Stoffen in energiereiche Stoffwechselprodukte. Diese Umwandlung geschieht durch die Zellatmung, die biologische Oxydation. Diese vollzieht sich in zahlreichen hintereinander geschalteten Oxydations-Reduktionsprozessen, die zum Teil reversibler, zum Teil irreversibler Natur sind und durch die stufenweise eine Abnahme der freien Energie der Substrate erfolgt.

Die Verbrennung eines Nährstoffes erfolgt also nicht durch unmittelbare Reaktion mit dem Sauerstoff sondern durch eine längere Kette von Reaktionen. Diese beginnt mit einer Abspaltung von Wasserstoff aus dem Substrat durch spezifische Dehydrogenasen. Der abgespaltene Wasserstoff wird dann durch wasserstoffübertragende Fermente dem Sauerstoff entgegen transportiert. Zuletzt wird dann das eigentliche Agens, das Elektron über eine Kette von elektronenübertragenden Fermenten, der Atmungskette, dem Sauerstoff zugeleitet.

Der Wirkungsort dieses respiratorischen Systems sind die Mitochondrien, bzw. Sarkosomen. Hier scheinen die Enzyme zu hochmolekularen Komplexen zusammengeschlossen zu sein, in welchen die einzelnen Komponenten in bestimmter räumlicher Beziehung zueinander stehen.

Die Zusammensetzung der Atmungskette ist nach wie vor Gegenstand reger Diskussion und ist bis auf wenige Teilreaktionen noch in keiner Weise gesichert. Allerdings scheint man heute durch isolierte Untersuchung einzelner Reaktionsgruppen unter Anwendung verschiedener Substrate n Hinzuziehung möglichst spezifischer Hemmstoffe an isolierten Mitochondrien tiefer in den Reaktionsmechanismus einzudringen. Durch Entwicklung empfindlicher spektralphotometrischer Untersuchungsmethoden konnten Chance und Mitarbeiter (14) die oxydierten und reduzierten Formen einzelner Komponenten direkt an intakten Mitochondrien messen.- Auf Grund dieser Untersuchungen gewann man folgendes von Slater 1955 vorgeschlagene Bild der Atmungskette.



Wie Belitzer und Tsibakowa 1939 als erste feststellten, werden während des Ablaufs der Atmungskette 2 - 3 Moleküle anorganisches Phosphat in energiereiche Verbindungen übergeführt. Dies geschieht, indem ADP durch anhydridartige Bindung eines Moleküls anorganischen Phosphats in ATP übergeführt wird.

Das Verhältnis von verbrauchtem Sauerstoff zu energiereich gebundenem Phosphat, der P/O-Quotient, wird allgemein als Maß der Energieausbeute verwendet.

Weder über den Mechanismus der oxydativen Phosphorylierung noch über Lage und Zahl der Reaktionsstufen, mit denen eine Phosphorylierung verbunden ist, ist sicheres bekannt.

Die Phosphorylierungsfähigkeit ist anscheinend an die Unversehrtheit der Struktur der Mitochondrien gebunden, da mit der Herauslösung des Enzymsystems aus den Mitochondrien auch dessen Phosphorylierungsfähigkeit verloren geht. Allerdings ist es Lehninger (15) in den letzten Jahren gelungen, durch Digitoninbehandlung von Mitochondrien ein Enzympräparat von relativ niedriger Partikelgrösse herzustellen, das das gesamte Enzymsystem der oxydativen Phosphorylierung zu enthalten scheint.

Lipman versuchte auf Grund thermodynamischer Berechnungen die Reaktionsfolge aufzuklären: Aus dem Gesamtreodoxpotential zwischen dem Substratwasserstoff und Sauerstoff von etwa 1,2 V. ergibt sich eine freie Enthalpie von ca. 56 Cal. Wenn, wie Lipman annahm, 12 Cal (nach neueren Berechnungen 8 Cal), zum Aufbau einer energiereichen Verbindung nötig sind und dieser eine Potentialdifferenz pro Elektronenpaar von 0,25 V entspricht, so könnten maximal 4 Moleküle ATP gebildet werden.

Der Abfall der freien Energie teilt sich auf den Ablauf der Atmungskette folgendermassen auf:

Reaktion läuft bis	mit $-\Delta F(\text{Cal/mol})$	Energiewechsel P ^o stufe	Redox. potential
Codehyd. I	4000	>	-290 mV
Diaphorase I	15000		
Cyt c	31000	>	+270 mV
$\frac{1}{2} \text{O}_2$	56000		

Tab. aus Baldwin: Biochemie

Danach könnten in folgenden Abschnitten der Atmungskette energiereiche Bindungen entstehen:

1. bei Übergang des Wasserstoffs von DPNH auf Diaphorase I;
2. zwischen Diaphorase I und Cytochrom c;
3. bei der Reoxydation des reduzierten Cyt. c.

Durch Anwendung verschiedener Substrate und möglichst spezifischer Hemmstoffe konnte man einzelne Reaktionsschritte isoliert untersuchen und dabei die P/O-Ausbeute bestimmen. Danach scheint es, zwischen Succinat und O_2 zur Bildung von 2 P Verbindungen, zwischen DPNH und Cytochrom c zu 2 P-Verbindungen und zwischen Cyt. c und Sauerstoff zu einer weiteren, also zwischen DPNH und Sauerstoff zu insgesamt 3 P-Verbindungen zu kommen.

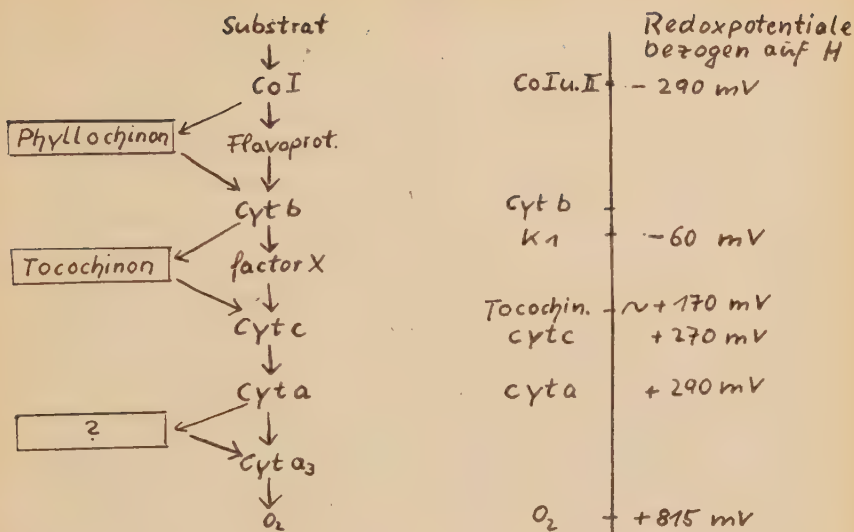
Da von verschiedenen Seiten bei Verwendung von α -Ketoglutarat ein höherer P/O-Quotient als 3 gemessen wurde, ist es möglich, dass zwischen α -Ketoglutarat und O_2 4 energiereiche Phosphatbindungen entstehen. (44)

Über den Mechanismus der oxydativen Phosphorylierung gibt es verschiedene Theorien. Zum Teil nimmt man an, dass zwischen Atmungskette und Phosphorylierung noch Reaktionen bestimmter Zwischensubstanzen eingeschaltet sind. Diese können entweder durch Oxydo-Reduktion an die Atmungskette angeschlossen sein, dabei müsste es entsprechend den drei Phosphorylierungsstufen

drei verschiedene Zwischensubstanzen geben oder die Kopplung an die Atmungskette läuft ohne Oxydo-Reduktion ab, dann könnten jeweils die gleiche Zwischensubstanz reagieren. (Slater (44)). Die Annahme solcher Zwischensubstanzen ist deshalb erforderlich, weil Atmung und Phosphorylierung voneinander gelöst, bzw. "entkoppelt" werden können, die Phosphorylierung kann durch verschiedene Substanzen unterdrückt werden, ohne dass dabei die Atmung unmittelbar beeinflusst wird. Dieser Entkopplungseffekt drückt sich in einer Senkung des P/O-Quotienten aus. Als Hemmstoffe oder Entkoppler dieser Art sind seit längerer Zeit verschiedene Phenole wie z.B. das 2,4-Dinitrophenol, ebenso wie das Antimycin A u.a. bekannt; sowie nach Martius (16) das Thyroxin, dessen Entkopplungseffekt allerdings umstritten ist (Lehninger). Ebenso wirken verschiedene Antikoagulantien wie z.B. das Dicumarol, das wir als Antivitamin K kennengelernt haben. Dabei ist zu beachten, dass weitgehende Übereinstimmung zwischen der Wirkungsstärke als Antikoagulans und als entkopplendes Agens besteht. Die Atmungskettenphosphorylierung wird ebenfalls entkoppelt, wenn kein organisches Phosphat oder ein geeigneter Phosphatacceptor wie ADP zur Verfügung steht. (Lehninger).

Im Sinne der oben genannten Zwischensubstanzen könnten das Phyllochinon und das α -Tocopherol reagieren, deren Beteiligung an der Atmungskette in den letzten Jahren von verschiedenen Seiten gefordert wurde.

Martius ergänzt die bisher angenommene Atmungskette dahingehend, dass nach seiner Meinung parallel zu dieser eine weitere Enzymkette geschaltet ist, bei deren Ablauf erst die Phosphorylierungsvorgänge stattfinden. So entwarf er 1954 folgendes Bild der phosphorylierenden Atmungskette. (16)



In diesem Schema nimmt Martius im Gegensatz zum Schema Slaters eine Beteiligung von cyt. b an der Oxydation des DPNH an. Dies schloß er aus der Beobachtung, dass bei Zugaben von Phyllochinon sehr rasch die Bande des reduzierten Cyt. b erscheint.

In seinem Schema der oxydativen Phosphorylierung schlägt Martius also zwei Alternativwege für den Wasserstoff vor, die unabhängig voneinander benutzt werden können. Nur beim Durchlaufen des Weges über Phyllochinon und Tocochinon wird Energie in Form energiereicher Phosphate gewonnen, während der bisher angenommene Weg der Atmungskette einen nicht-phosphorylierenden Seitenweg darstellt.

Vitamin K und oxydative Phosphorylierung.

Martius (16,17,18,19,20) schloß aus folgenden Beobachtungen auf eine Beteiligung des Phyllochinons an der oxydativen Phosphorylierung:

1. Stoffe mit Antivitamin-K-Eigenschaften wie das Dicumarol und Cumarin und andere entkoppeln in gleicher Weise wie 2,4-Dinitrophenol und Thyroxin die oxydative Phosphorylierung;

2. Lebermitochondrien vit.-K-frei ernährter Kücken zeigten eine deutlich verringerte Phosphorylierungsrate im Vergleich zu normal ernährten.
3. Zusatz von K, in geeigneten Konzentrationen ($10^{-5}m$) zu Lebermitochondrien K-frei ernährter Kücken steigerte die Phosphorylierung um 30 - 50 %. Das ist der zu erwartende Wert, wenn das Phyllochinon an einer der drei Phosphorylierungsstufen beteiligt ist;
4. eine Beteiligung des K_1 am Wasserstofftransport zwischen DPNH und den Cytochromen setzt eine Reaktion zwischen den reduzierten Formen der Co-Dehydrasen und der oxydierten Formen des Phyllochinons voraus. Eine solche wird vermittelt durch eine Phyllochinonreduktase, die sich aus Mitochondrien isolieren lässt und welche Wasserstoff von DPNH auf Phyllochinon überträgt. Die Oxydation des gebildeten Phyllohydrochinons erfolgt durch das Cyt. b, wodurch die Stellung des K_1 in der Atmungskette eindeutig festgelegt ist.

Bei der Phyllochinonreduktase (21,22) handelt es sich um ein bisher unbekanntes Flavoprotein, welches FAD als Wirkungsgruppe enthält. Seine Umsatzzahl beträgt 1×10^6 gegenüber einer Umsatzzahl in Höhe von 6.000 bis 20.000 der anderen Flavoproteine. Es wird durch Dicumarol schon in sehr niedriger Konzentration gehemmt, jedoch nicht durch Dinitrophenol.

5. Das Vitamin K kommt in den Mitochondrien in einer Menge vor, die den Konzentrationen der anderen Atmungsfermente entspricht. Besonders auffallend ist der relativ hohe Gehalt der Herzsarkosomen, der mit einer Funktion des Vitamin K als antihämorrhagisches Vitamin dort kaum in Zusammenhang gebracht werden kann. Diese selektive Anhäufung in einem Organ mit einem besonders hohen Sauerstoffverbrauch ist im Hinblick auf die diskutierte Rolle sehr gut erklärlich.

Nach seinem negativen Redoxpotential (-363 mV bei $p_H = 0$) müßte das Phyllochinon ziemlich am Anfang der Atmungskette

stehen. Die Stellung des Phyllochinons geht nach Martius auch aus der Tatsache hervor, daß man bei Verwendung von Succinat als Substrat, dessen Wasserstoff ja die Atmungskette erst auf der Stufe der Cytochroms erreicht, eine wesentlich geringere Differenz der Phosphorylierungsraten zwischen Normal- und K-Mangel-Tieren beobachtet, als bei Verwendung von α -Oxybutyrat.

Den Effekt der Entkopplung sieht Martius in einem Mechanismus, durch den der eine mit Phosphorylierung verbundene Weg für den Wasserstoff versperrt wird, was eine Atmung ohne Phosphorylierung zur Folge hat. Wie sich durch spektroskopische Verfolgung der Reduktion von Phyllochinon durch DPNH und Phyllochinonreduktase zeigen ließ, läßt sich diese Reaktion durch entkoppelnd wirkende Stoffe wie Thyroxin oder Dicumarol in vitro hemmen.

Allerdings wendet Lehninger, (25,26,27) und hier setzt seine Kritik an der Martius'schen Auffassung an, auf Grund der Feststellung, daß Dicumarol sowohl vor als auch nach Cyt. c entkoppelt, ein, daß durch Dicumarol nicht nur die erste Phosphorylierungsstufe, sondern auch die beiden weiteren entkoppelt werden. Aus der Tatsache, daß alle drei Phosphorylierungsstufen entkoppelt werden, schließt Lehninger, : entweder ist Vitamin K nicht nur am Elektronentransport zwischen DPNH und Cyt. c beteiligt oder aber wirkt es nicht als Elektronenüberträger, sondern als Bestandteil eines phosphatübertragenden Systems, welches für die Bildung von ATP aus einer primären energiereichen Bindung an allen drei Stellen der Phosphorylierung in der Atmungskette verantwortlich ist.

Konstitution des Vitamins K und oxydative Phosphorylierung.

Zur Frage der Konstitution der im Organismus aktiven Verbindung hat Martius (20) verschiedene Verbindungen mit Vitamin K-Eigenschaften geprüft. Er konnte dabei übereinstimmend mit anderen

Autoren zeigen, dass nur Vitamin-K-analoga mit ähnlich langer Seitenkette wie das Phyllochinon die Phosphorylierung fördern. 2, -Methyl-1,4-Naphtochinon (Menadion) oder andere Verbindungen mit kurzer oder fehlender Seitenkette wirken dagegen hemmend. Der Naphthochinonring vermag also nur als Redoxsystem zu wirken, während zur Wirkung in den Phosphorylierungsvorgängen eine Seitenkette, in Form des Phytyls notwendig ist. Diese Seitenkette ist offenbar notwendig, um die eigentliche Wirkgruppe, das Naphthochinonredoxsystem, in geeigneter Weise an strukturbildende Lipoids substanz der Zelle zu verankern. Nach der Auffassung von Martius stellt also Menadion ein Provitamin K dar, das erst im Organismus durch Einführung des Phytylrestes in die wirksame Substanz übergeführt wird.

Nason (28,29) isolierte 1953 aus *Esch. coli*, das besonders hohe Konzentrationen von Vitamin K enthält, ein Enzym, das den Wasserstoff von DPNH auf Menadion zu übertragen vermag. Dieses wird ebenfalls durch Dinitrophenol und Dikumarol kompetitiv gehemmt. Andererseits wurde von verschiedenen Seiten, ebenso wie von Martius die Beobachtung gemacht, dass das Menadion in höheren Konzentrationen die oxydative Phosphorylierung hemmt. Dies kann man dadurch erklären, daß das Menadion den Elektronentransport auf einen nicht mit Phosphatbindung verbundenen Seitenweg leitet.

Slater (30) hat die Martius'sche Theorie aufgegriffen und zum Gegenstand eingehender Untersuchungen an einem Enzympräparat aus Pferdeherzmuskel (Keilin und Hartree) gemacht. Er knüpft folgende Bedingungen an eine Funktion von Vitamin K als Wasserstoffüberträger zwischen DPNH und Cyt. b:

1. muß reduziertes Vitamin K durch ein Atmungskettenpräparat wieder sehr rasch oxydiert werden.
2. muß reduziertes K oder DPNH + K in Gegenwart von Phyllochinonreduktase sehr rasch Cyt. b reduzieren.

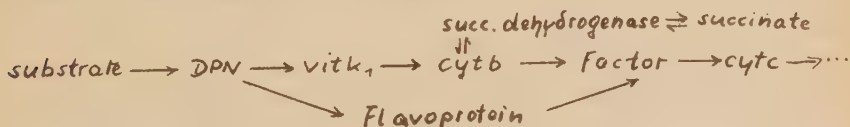
3. muß Fumarat reduziertes K sehr rasch oxydieren oder in Gegenwart von K und Phyllochinonreduktase DPNH oxydieren.

Slater vermochte die von Martius beschriebene Phyllochinon-reduktase nicht herzustellen und die Schwierigkeit, Phyllochinon in reduzierter Form zu erhalten, veranlasste ihn, Menadion (K_3) als Modellverbindung für Vitamin K an einem Atmungskettenpräparat nach Keilin und Hartree zu verwenden, und kam zu folgenden Ergebnissen:

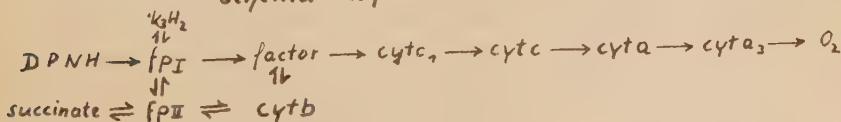
1. reduziertes Menadion (K_3H_2) wird durch ein Keilin-Hartree Atmungskettenpräparat sehr rasch oxydiert. Diese enzymatische Oxydation von K_3H_2 wird vollständig durch Cyanid und Antimycin gehemmt. Die Oxydation ist mit dinitrophenol-empfindlicher Phosphorylierung verbunden.
2. Andererseits verläuft die anaerobe Reaktion zwischen DPNH und K_3 wesentlich langsamer als die aerobe Oxydation von DPNH.
3. Die anaerobe Reaktion zwischen DPNH und Fumarat wird nicht durch K_3 oder K_1 katalysiert.
4. Die anaerobe Reaktion zwischen K_3 und Bernsteinsäure verläuft langsamer als die aerobe Oxydation von K_3H_2 , Succinat oder DPNH.

Slater schließt auf Grund dieser Befunde, daß Vitamin K_3 , und wahrscheinlich auch K_1 nicht zwischen DPNH und Cytochrom b, also nicht auf dem Hauptweg der Atmungskette, liegt.

Zum Vergleich der Ansichten von Martius und Slater seien zwei Schemata der Atmungskette angegeben.



Schema nach Martius



Schema nach Slater (1958)

Slater führt noch weitere Befunde an, wie z.B. die Feststellung, dass in seinem aus Herzsarkosomen gewonnenen Enzympräparat Vitamin K nicht in genügender Menge, d.h. in einer den bekannten Gliedern der Atmungskette entsprechenden Konzentration, vorhanden ist und diskutiert verschiedene Argumente für und wider eine Beteiligung des Vit. K an der Atmungskette. Er kommt dabei zu dem Schluß, daß seine Untersuchungen diese Annahme weder absolut beweisen noch widerlegen.

Es besteht die Frage, in wieweit man K_3 als Modell für K_1 ansehen kann, das ja, wie verschiedentlich festgestellt wurde, sich in seiner Wirkung sehr von K_1 unterscheidet.

In letzter Zeit versuchten 2 weitere Arbeitskreise, eine Rolle des Vitamins K_1 als Coenzym der oxydativen Phosphorylierung durch ultraviolette Bestrahlung und damit verbundener Inaktivierung eines Enzympräparates nachzuweisen.

Man ging dabei von der Annahme aus, daß durch UV-Licht das Phyllochinon zerstört wird.

Dallam und Anderson (31) setzten ein Lebermitochondrienpräparat einer ultravioletten Bestrahlung aus, worauf der P/O-Quotient der Oxydation von β -Hydroxybutyrat um $2/3$ absank, ohne dass die Sauerstoffaufnahme verändert wurde. Wenn sie K_1 zugeben, so wurde der normale P/O-Quotient wiederhergestellt.

Der 2. Arbeitskreis (32) bestrahlte einen Extrakt aus Myobacterium phlei. Die Aktivität dieses Enzymsystems war von dem Vorhandensein subzellularer Partikel und löslicher Enzyme des Überstehenden (auch Menadionreduktase) abhängig. Durch UV-Bestrahlung der Partikel erlosch die Fähigkeit des Systems zur Atmung und Phosphorylierung, während diese bei Zugabe von - in dem inaktivierten Lipoidmaterial suspendierten K_1 wiederhergestellt wurde. Bestrahlte man diese K_1 -Lipidsuspension, so wurde das Vit. K völlig inaktiviert. Die Reaktivierung durch K_1 wurde durch Dicumarol und Dinitrophenol verhindert. Menadion, K_2 und ebenso Tocopherol erwiesen sich als inaktiv.

Analog der Rolle in der Atmungskettenphosphorylierung im tierischen Organismus wird von verschiedenen Seiten eine ebensolche grundlegende Wirkung des Phyllochinons in der Photosynthese gefordert, bei welcher es analog zur Atmungskette Bestandteil einer phosphorylierenden Enzymkette sein soll (Wessels (33), Arnon (34).)

Da das Vitamin K in hoher Konzentration in den Chloroplasten der grünen Pflanzenteile vorhanden ist; weiterhin nach Redoxpotentialmessungen bei der Hill-Reaktion ein intermediärer Wasserstoffüberträger vorhanden sein muss und da ausserdem die Photosynthese durch Hemmstoffe wie Dicumarol und Dinitrophenol sowie durch Menadion gehemmt wird, glaubt Wessels (33), daß das Phyllochinon in der Enzymkette der Photosynthetischen Phosphorylierung zwischen Flavinmononucleotid und Ascorbinsäure wirkt.

Wessels stellt sich diese Wirkung so vor: Vitamin K wird bei der Photosynthese durch Ascorbinsäure reduziert und durch Cytochrom c reoxydiert. Dabei läuft eine Phosphorylierung ab. Bei der Oxydation des reduzierten Vitamins durch das Cytochrom entsteht eine tautomere Form des Vitamins K in phosphoryliertem Zustand. Die Spaltung dieser Verbindung ermöglicht die Bildung einer stabilen Chinonstruktur des Vit. K. Die Phosphatbindung der tautomeren K-Form ist energiereich; seine Phosphatgruppe wird bei der Spaltung auf ADP übertragen.

Ähnlich ließe sich der Mechanismus der Kopplung zwischen Oxydation und Phosphorylierung durch Vit. K erklären.

Das ubiquitäre Vorkommen des Vitamins K und namentlich der hohe Gehalt der Chloroplasten, der den Mitochondrien im tierischen Organismus entsprechenden Träger des Energiestoffwechsels in der Pflanze, machen eine solche Rolle durchaus wahrscheinlich.

Wenn, wie Martius annimmt, die Übertragung des Wasserstoffs von DPNH auf die Cytochrome und die erste Phosphorylierungsstufe durch das Phyllochinon vermittelt wird, so erhebt sich die

Frage, welche Substanz für die weiteren Phosphorylierungsstufen verantwortlich ist. Hier liegt eine entsprechende Rolle des Tocopherols nahe, da dieses, wie das Phyllochinon, ein mit einer Phitylgruppe substituiertes Hydrochinon darstellt.

Vitamin E und oxydative Phosphorylierung

Eine Wirkung des Vitamins E im Phosphatstoffwechsel und an der Gewebsatmung war, wie schon erwähnt, auf Grund der Beobachtungen am E-mangeldystrophischen Muskel wiederholt diskutiert worden. (Weil-Malherbe, Friedman und Matill u.a.) Verschiedene Untersuchungen mit Atmungskettenpräparaten führten zu sehr unterschiedlichen z.T. widersprechenden Ergebnissen.

Martius (21) fand, dass die Phosphorylierungsrate in Zwerchfellstücken E-frei ernährter Kaninchen bedeutend niedriger war als bei normalen Tieren, während der O_2 -Verbrauch nahezu gleich blieb. Bei Verwendung von Succinat als Substrat konnte er bei den Mangeltieren einen nur halb so hohen P/O-Quotienten feststellen wie bei den Normaltieren, während der Unterschied bei Verwendung von Hydroxybutyrat als Wasserstoffdonator geringer war, was für die Annahme spricht, dass Tocopherol an der zweiten Phosphorylierungsstufe, nämlich bei der Übertragung des Wasserstoffs von Cyt. b auf Cyt. c beteiligt ist.

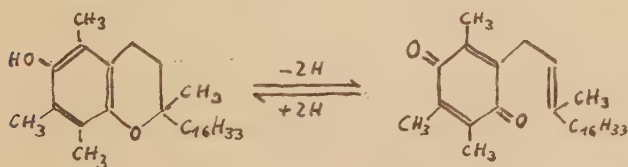
Martius führt als Beweis für seine Annahme auch die Beobachtung an, daß man in Lebermitochondrien kaum Unterschiede im P/O-Quotienten zwischen normalen und E-Mangeltieren findet. Dies hatten schon Rabinowitz und Boyer an Herzhomogenaten festgestellt. (35) Martius erklärt dies damit, dass sich das chemisch sehr stabile Vitamin sehr lang im Körper hält und von den lebenswichtigen Organen besonders lang zurückgehalten wird, so dass sich der Mangel zuerst an weniger lebenswichtigen Organen wie Skelettmuskel und Fortpflanzungsorganen bemerkbar macht. In vitro allerdings konnte Martius (21) durch Zusatz von α -Tocopherol, α -Tocopheroxyd, α -Tocopherylchinon und α -Tocopherylhydrochinon zu Zwerchfellstückchen E-frei ernährter Tiere

eine Erhöhung der Phosphorylierungsrate von nur 10 % erzielen.

Der Wirkungsort des Vitamins E liegt nach Martius (21) zwischen Cyt. b und Cyt. c (siehe Schema); bezüglich der wirk-
samen Form glaubte Martius zunächst, daß diese im Tocochinon zu
suchen ist, das durch Aufnahme von 2 H-Atomen wahrscheinlich
von Cyt. b zu Tocohydrochinon reduziert und durch Cyt. c wie-
der reoxydiert wird. Nach seinem Redoxpotential liegt es zwi-
schen Cyt. b und c. und ist um ca. 230 mV positiver als das
 K_1 . Diese Potentialdifferenz entspricht gerade der Bildung ei-
ner energiereichen Phosphatverbindung. Da auch diese zweite
Phosphorylierungsstufe durch dieselben Stoffe entkoppelt wird
wie die erste Stufe, und weiterhin die oxydative Phosphorylie-
rung durch sämtliche Entkopplungsgifte vollständig gehemmt wer-
den kann, sieht Martius in der Annahme eines dem Phyllochinon-
systems entsprechenden Umschaltweges eine mögliche Erklärung.

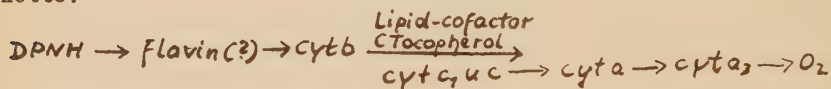
Neuerdings glaubt Martius (3), daß nicht das Tocopheryl-
hydrochinon, sondern das Phytyltrimethylbenzochinon das wasser-
stoffübertragende Zwischenprodukt sei. Zu dieser Annahme kam
er auf Grund von Feststellungen, die er nach Gaben von radio-
aktiv markiertem Tocopherol an E-frei ernährten Kaninchen ma-
chen konnte, Aus den isolierten Lebermitochondrien dieser Tie-
re konnten neben unverändertem Tocopherol auch grössere Mengen
einer Substanz isoliert werden, die sich durch Reduktion in
saurer Lösung zu Tocopherol zurückbildete. Aus dem Verteilungs-
koeffizienten war mit Sicherheit zu schliessen, daß es sich
hierbei nicht um Tocochinon, sondern mit größter Wahrschein-
lichkeit um das Trimethylbenzochinon handelte.

Die Reaktion läuft folgendermaßen ab:



1954 zeigten Versuche von Nason und Lehmann (36), daß das α -Tocopherol an der Übertragung des Wasserstoffes vom reduzierten DPN auf Cyt. c eine Rolle spielen könnte.

Bei Verwendung eines hochgereinigten Präparates von DPNH-cyt. c. - Reduktase aus Mitochondrien ließ sich durch Behandlung mit Isooctan ein Cofaktor von Lipoidcharakter entfernen, wodurch eine fast vollständige Inaktivierung des Fermentsystems erfolgt. Der extrahierte Faktor kann in spezifischer Weise durch Tocopherol ersetzt werden, wodurch das System wieder voll aktiv wird. Allerdings zeigte sich später, dass Zusatz des extrahierten Lipoidmaterials oder von Rinderserumalbumin dieselbe Erholung des Systems zur Folge hatte. (37). Weder im Isooctanextrakt noch in Serumalbumin konnte Nason Tocopherol finden, ausserdem wurde durch die Extraktion nur 10 bis 20 % des Tocopherolgehaltes aus dem Enzympräparat entfernt, während der Aktivitätsverlust nahezu 90 % betrug. So kam Nason zu dem Schluß, daß das eigentliche Agens ein unbekannter Lipoidcofaktor sei, den Tocopherol zu ersetzen vermag. (37, 38). Er hätte nach Nason folgende Stellung in der Atmungskette:



Als allerdings Slater (4) sowohl in Rinderserumalbumin als auch in einer Suspension eines Herzmuskelenzympräparates Tocopherol in Mengen von 1,1 $\mu\text{Mol/g}$ Protein bzw. 0,056 $\mu\text{Mol/g}$ Protein (s. oben) feststellen konnte und Nason seinerseits mit der von Slater angewandten Methode sogar erheblich grössere Mengen von Tocopherol fand, neigte er wiederum mehr zu einer Annahme des Tocopherols als wirksamen Agens'. (39) Ausserdem erwies sich nach einer bestimmten Behandlung des Präparates nur noch das Tocopherol als aktiv, während sich die anderen Lipide als unwirksam erwiesen. Nason interpretiert sei-

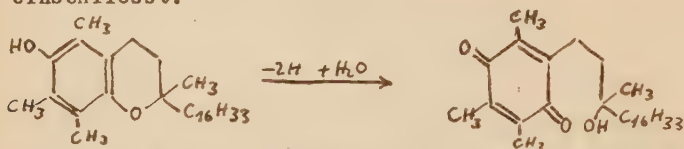
ne verschiedenen Ergebnisse dahingehend, dass endogenes Vit.E durch die Isooktanbehandlung von den "aktiven Bezirken" des Enzyms entfernt und durch das Lipidmaterial an diesen Wirkungs-ort zurückgebracht wird. Allerdings lässt Nason die Frage offen, ob das Vit.Eaktiv an der Übertragung des Wasserstoffes beteiligt ist, d.h. während des Ablaufes der Atmungskette fortwährend Reduktion und Oxydation erleidet oder nur als bindender Stoff (im Sinne von Bücher (40) wirkt. Er hält es auch für möglich, daß nur geringe Mengen von Tocopherol von der Oxydoreduktion betroffen sind, womit die Beobachtung von Slater (41) übereinstimmt, der spektroskopisch keinen Oxydations-Reduktionswechsel des Tocopherols feststellen konnte.

Slater (41,42) hat die Untersuchungen Nasons aufgegriffen und knüpft an die Beteiligung des Vit. E wiederum folgende Bedingungen:

1. Inaktivierung eines Enzymsystems durch Herauslösung einer bestimmten Substanz aus dem Präparat und spezifische Wiederherstellung der Aktivität durch Wiedertzugabe der Substanz;
2. Vorhandensein des Stoffes im Präparat in den anderen Fermenten entsprechenden Mengen.
3. Oxydation und Reduktion in einem der Enzymaktivität entsprechenden Umfang.

Die erste Bedingung würde das Tocopherol nach den Ergebnissen Nasons, die Slater weitgehend bestätigen konnte, - keine Übereinstimmung herrscht über die Antimyzinabhängigkeit - erfüllen. Der zweiten Bedingung genügt es im selben Masse wie die anderen Fermente der Atmungskette. Hierbei ist noch zu betonen, dass sich das gesamte von Slater identifizierte Tocopherol in der Mitochondrienfraktion fand. Hinsichtlich der dritten Bedingung konnte Slater nicht den Beweis erbringen, dass Tocopherol in einem Herzmuskelpräparat durch O_2 oder Cyt. c oxydiert oder das entsprechende Chinon durch DPNH oder Succinat reduziert wird. (Martius: Benzochinon!)

Slater weist auch auf die Möglichkeit hin, dass die Inaktivierung der DPNH - Cytochromreduktase durch physikalische Schädigung der Partikel oder durch Adsorption des Isooctans an der Enzymoberfläche und die Reaktivierung durch Tocopherol durch Ablösung des Isooctan oder Wiederherstellung der molekularen und histologischen Struktur verursacht wird. Anschliessend diskutiert Slater noch einen Mechanismus, in welchem Sinne Tocopherol bei der Bildung energiereicher Phosphatverbindungen wirken könnte. Er führt hier noch als Argument an, dass nämlich die Oxydation des Tocopherols zu seinem Chinon nicht nur in der Abgabe von 2 Wasserstoffatomen besteht, sondern auch Addition von Wasser und Öffnung des Chromanringes einschliesst.



Damit ist die Möglichkeit gegeben, dass Phosphat die Stelle des Wassers in der Zelle einnimmt, in-dem sie zur Bildung einer energiereichen Zwischenverbindung führt, die ihre Phosphatgruppe auf ADP übertragen kann. Die Summe dieser Reaktion ist:

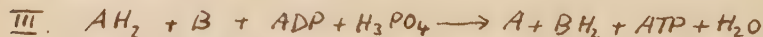


(B wäre also der Acceptor der H-Atome des Tocopherols)

In einer Reaktion ohne Phosphor könnte Tocopherylchinon reduziert und dehydratisiert werden.



Die Summe von I und II ist III.



Dieser Mechanismus entspräche dem von Lipman 1946 vorgeschlagenen Mechanismus der Phosphorylierung, sowie der von Martius angenommenen Funktion des Tocopherols.

Teil II

Martius (21) fand bei seinen Untersuchungen an Lebermitochondrien nur geringe Unterschiede des P/O-Quotienten zwischen normal- und E-frei ernährten Tieren. Dies ist wohl auf die Schwierigkeit zurückzuführen, wirkliche E-freie Versuchstiere zu erhalten. Der Organismus besitzt im Fettgewebe ein ausgedehntes Reservoir an Vitamin E, ausserdem scheint es von den lebenswichtigen Organen mit besonderer Zähigkeit festgehalten zu werden.

Diese Schwierigkeiten, ein genügend Vitamin E-verarmtes Präparat zu erhalten, veranlassten uns, an einem isolierten, also von jeder Nahrungszufuhr und von Reserven aus anderen Organen abgeschnittenen, aber lebenden Organ, dem überlebenden Froschherz nach Straub, die Stoffwechselwirkung des Vitamin E zu untersuchen. Hierbei machten wir uns die Erfahrung zu nutze, daß das isolierte Froschherz bei längerer Durchströmung mit Tyrodelösung bei fortgesetzter Arbeit in seiner Leistung abnimmt, was in einem allmählichen Absinken der Kontraktionsstärke des Ventrikels seinen Ausdruck findet.

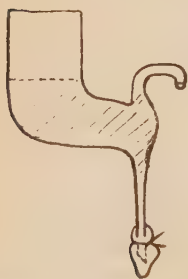
Wie die späteren Versuche zeigen, verarmt das Froschherz durch diese Behandlung sowohl an Substraten als auch an Katalysatoren. Im Zustand dieser Verarmung scheint uns das isolierte Froschherz ein gut geeignetes Objekt zu sein, um die Wirkung der Chinonderivate E und K auf den Energiestoffwechsel und speziell auf Vorgänge der oxydativen Phosphorylierung zu untersuchen. Dies kann in zweifacher Weise geschehen; einmal physiologisch durch Ermittlung der Leistungssteigerung des Organs, gemessen an der Zunahme der Muskelarbeit, die abhängig ist von der Menge des gebildeten ATP. Weiterhin chemisch durch Bestimmung der gebildeten energiereichen Phosphatverbindungen oder durch Bestimmung des P/O-Quotienten der aus dem Organ isolierten Mitochondrien. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem ersten Kriterium.

Methodik

Verwendet wurden männliche Temporarien und Eskulenten. Das Versuchsmaterial war zu den verschiedenen Jahreszeiten sehr unterschiedlich. So verarmten Sommerfrösche (weitgehend Eskulenten) schon sehr rasch; Winterfrösche, die in einem dem Winterschlaf ähnlichen Zustand waren, erst nach sehr langer Durchströmung. Dieser Tatsache wurde durch eine relativ grosse Anzahl von Versuchen Rechnung getragen.

Nach Dekapitation des Frosches und Zerstörung des Rückenmarks, durch Trennung des Brustbeins, Eröffnung und Abpräparation des Herzbeutels wurde die Spitze einer Straub-Kanüle durch die linke Aorta in den Ventrikel eingeschoben und über den Vorhöfen befestigt. Anschliessend wurde das Herz von seinen dorsalen Verbindungen gelöst, die Vorhöfe gegen den Venensinus abgebunden, um ein Undichtwerden des Herzens während der langen Versuchsdauer zu vermeiden.

Anstatt der normalen Straub-Kanüle wurde eine solche nach Scheibe und Niemer (44) modifizierte verwendet. (s. Abb.)



Unmittelbar über dem in den Ventrikel führenden Zulaufstutzen ist ein Überlaufröhrchen angebracht. Dadurch konnte die dem Herzen zugeführte und durch die Systole des Ventrikels wieder ausgetriebene Tyrodelösung wieder abgeführt werden, so dass jede mechanische Beeinflussung der Kontraktionsstärke durch wechselnden Kanüleninhalt vermieden werden konnte. Das auf der Kanüle fixierte Herz

wurde in eine feuchte Kammer gebracht und die Herzrevolution auf einen mit einer Klemme an der Herzspitze befestigten Schreibhebel übertragen und an einem Schleifenkymographion registriert.

Unmittelbar nach der Präparation arbeitete das Herz mit voller Wirkungsstärke. Diese wurde registriert und anschliessend das Herz 15 bis 18 Stunden mit brennstofffreier, sauerstoffgesättigter Tyrodelösung durchströmt.

Die Menge der Durchströmungsflüssigkeit betrug im Durchschnitt 800 - 1000 ml.

Im Laufe der Durchströmungszeit sank die Amplitude der Ventrikelkontraktion auf durchschnittlich 25 Prozent der Ausgangshubhöhe. Diese wurde wieder registriert.

Im folgenden Teil der Versuche wurde die zu untersuchende Substanz in die Kanüle gebracht und zwei Stunden darin belassen. Während dieser Zeit erfolgte ständige Registrierung. Die Ergebnisse wurden anschliessend statistisch ausgewertet.

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse.

Es wurden bei der statistischen Auswertung jeweils die nach 120 min ermittelten Mittelwerte des Leistungszuwachses, der sich in einer prozentualen Zunahme der Amplituden ausdrückt, miteinander verglichen und die entsprechenden Werte für die Signifikante K errechnet. Die Berechnung von K erfolgte nach folgender Formel:

$$K = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}}$$

Hierfür bedurfte es noch der Bestimmung der Werte δ und ε . Mit dem Symbol δ wird die mittlere Abweichung oder Streuung der Werte einer Versuchsserie angegeben, während ε den mittleren Fehler oder die mittlere Abweichung der einzelnen Mittelwerte bezeichnet.

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$$

$$\varepsilon = \frac{\delta}{\sqrt{n}}$$

Verbindungen und Lösungen

Die Tyrodelösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

NaCl	0,65	%	alle Substanzen pro analysi
KCl	0,02	%	
MgCl	0,01	%	
CaCl ₂	0,02	%	
NaHCO ₃	0,07	%	
NaH ₂ PO ₄	0,005	%	

Die Angaben beziehen sich auf kristallwasserfreie Trockensubstanz. Die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung betrug:

$p_H = 7,8$. Für die Gefrierpunktserniedrigung ergab sich ein Wert von: $0,43^\circ$, für den osmotischen Druck $p_t = 5,65$.

α -Tocopherol, α -Tocopherolacetat, 2,4-Dinitrophenol stammte von der Fa. Merck, Darmstadt. Phyllochinon, Menadion und Dicumarol wurden uns freundlicherweise von der Hoffmann-La Roche A.G. unentgeltlich zur Verfügung gestellt. ATP als Dinatriumsalz stammte von der Zellstoffabrik Waldhof.

Da die Vitamine E und K wasserunlöslich sind und unspezifische Einflüsse durch Verwendung eines Lösungsvermittlers vermieden werden sollten, war eine geeignete Methode ausfindig zu machen, um diese in möglichst fein verteilter Form zu suspendieren. Hier erwies sich ein Ultraschallhomogenisator als sehr geeignet. Aus 50 bis 100 mg Tocopherol bzw. Phyllochinon wurde in ca. 50 min bei einer Temperatur von 65 bis 70° eine trübe emulsionsartige Lösung auf diese Weise hergestellt. In dieser fanden sich Öltröpfchen bis zu einer Grösse, die unter dem Lichtmikroskop mit Ölimmersion gerade noch sichtbar waren.

Von Menadion wurde in einem Glaspotter eine blassgrünliche Emulsion hergestellt; für andere Versuche wurde es in Tween 20 gelöst.

Die Konzentration von Vitamin E und K sowie von Menadion und Dicumarol wurde nach Extraktion aus der Emulsion bzw. Suspension gravimetrisch bestimmt.

Um eine Bezugskurve für die Versuche mit Hydrochinonderivaten zu gewinnen, wurde dem ermüdeten Froschherzen zunächst eine nur mit Brennstoffen, und zwar mit 0,2 Prozent Fruktose versehene Tyrodelösung angeboten. In dieser Versuchsreihe wurden 40 Versuche durchgeführt, 20 davon gleichzeitig mit den Vitamin-E-Versuchen, um eine mögliche Verzerrung des Ergebnisses durch verschiedenartiges Versuchsmaterial auszuschalten.

In 2 Versuchsreihen von 39 bzw. 31 Versuchen wurde dem ermüdeten Herzen neben Fruktose Vitamin E und Vitamin K in molaren Konzentrationen von $1,36 \times 10^{-4}$ (E) bzw. $1,33 \times 10^{-4}$ m (K) gegeben. In einer weiteren Reihe von Versuchen wurde der Tyrodelösung ausser Fruktose ATP in einer molaren Konzentration von $2,7 \times 10^{-5}$ m zugesetzt. Da anzunehmen ist, daß die verminderte Leistung des verarmten Herzens Ausdruck einer ungenügenden Bildung energiereichen Phosphats, also eines ATP-Mangels ist, sollte in dieser Versuchsreihe ermittelt werden, in wie weit von aussen zugeführtes ATP die normale Leistung wiederherzustellen vermag und diese Leistungssteigerung mit der Wirkung der Vitamine in Beziehung gesetzt werden.

Weitere Versuche wurden unternommen, um eine Stoffwechselwirkung von Menadion ($1,53 \times 10^{-5}$ m) zu untersuchen.

Abschliessend führten wir einzelne Versuche durch, um die Wirkung bestimmter als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung bekannter Stoffe wie Dicumarol und Dinitrophenol am überlebenden Herzpräparat zu untersuchen.

Ergebnisse

Die Durchschnittswerte des Kurvenverlaufs mit Fruktose (0,2 g) und nach Zugabe von Tocopherol ($1,36 \times 10^{-4} \text{ m}$), Phyllochinon ($1,33 \times 10^{-4} \text{ m}$) und ATP ($2,7 \times 10^{-5} \text{ m}$) sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Substanz	Anzahl d.Vers.	Ermüdg.	Erholung			Diff.
			nach 10	60	120 min.	
Fruct.	40	25,62	33,9	33,7	34,6	8,98
Tocoph.	39	18,43	33,35	41,36	41,98	23,55
Phyll.	31	24,25	49,5	53,92	53,34	29,09
ATP	19	28,8	58,0	53,0	60,3	31,5

Differenz: Unterschied zwischen Ermüdungshubhöhe und der Erholungshubhöhe nach 120 min.

Durchschnittswerte der Versuchsreihen in % der Ausgangshubhöhe

1. Fruktose.

Wurde dem ermüdeten Herzen Fruktose (0,2 g) allein angeboten, so erfolgte nur eine geringe Steigerung der Hubhöhe. Dabei stieg der Ermüdungswert von 25,6 % innerhalb von 10 min. auf 33,9 % der Ausgangsamplitude und blieb auf dieser Höhe. (Siehe Kurve 1) Fruktose vermag also die Leistung des ermüdeten Herzens nur um 8 - 9 % zu steigern, wie dies auch schon frühere Untersucher (46, 47) zu zeigen vermochten. Zufuhr von Kohlehydraten allein vermag also die Leistung des ermüdeten Organs nur in geringem Maße zu steigern. Die 15-stündige Durchströmung hat also nicht nur zu einer Verarmung des Herzens an Brennstoffen sondern auch an Stoffwechselkatalysatoren geführt.

2. Tocopherol.

In einer Reihe von 39 Versuchen wurde dem Froschherzen Tocopherol ($136 \times 10^{-4} \text{ m}$) zusammen mit Fruktose gegeben. Hier wurde ein Ermüdungswert von 18,4 % ermittelt. Nach Zugabe des Tocopherols stieg die Amplitude innerhalb von 10 min. auf 33,4 %,

nach 60 min auf 41,1 % und erreichte nach 120 min einen Endwert von 42 %. Der maximale Leistungszuwachs betrug also für Vit. E 23,6 % (siehe Originalkurve 2). In einigen Versuchen wurde am einzelnen Herzpräparat zunächst nur Fructose zugesetzt und erst später Tocopherol zugegeben, worauf, wie Kurve (2a) zeigt, eine weitere Vergrößerung der Amplitude erfolgte.

3. Phyllochinon

In einer weiteren Versuchsreihe wurde Vitamin K₁ ($1,33 \times 10^{-4} \text{ m}$) und Fructose zugegeben. Der Durchschnittswert der Ermüdung betrug bei diesen 31 Versuchen 24 % der Ausgangshubhöhe. Nach Zugabe stieg die Amplitude sehr rasch an und erreichte schon nach 10 min einen Wert von fast 50 %, stieg noch auf 54 % bei 60 min und blieb auf dieser Höhe oder fiel wieder etwas ab, so dass sich nach 120 min ein Durchschnittswert von 53,3 % ergab. Es findet sich also beim Einsatz von Phyllochinon eine Leistungssteigerung von max. 30 % bzw. 29 % nach 120 min (3). Wie in der Reihe der Versuche mit Tocopherol wurde auch hier am einzelnen Herzen zunächst nur Brennstoff angeboten und erst später Phyllochinon zugesetzt. Die leistungssteigernde Wirkung drückt sich hier besonders deutlich in einer erheblichen Vergrößerung der Hubhöhe aus. (3a)

4. ATP

In einer Versuchsreihe von 19 Versuchen, die einen Mittelwert der Ermüdungshubhöhe von 28,8 % ergaben, wurde der Tyrodelösung ATP ($2,7 \times 10^{-5} \text{ m}$) mit Fructose (0,2 g) zugesetzt. Wie Kurve 4 zeigt, kontrahierte sich der Muskel nach Zugabe von ATP mehrmals sehr stark, sank dann auf eine oft unter dem Ermüdungswert liegende Amplitude ab und stieg dann innerhalb von 20 min auf ein erstes Maximum von 58 % der Ausgangshubhöhe an. Nach diesem Maximum sank die Hubhöhe im Laufe von weiteren 30 min wieder auf einen Wert von 53 % bei 50 min ab und stieg dann allmählich wieder auf 60,3 % an. Dieser Kurvenverlauf re-

sultiert vermutlich aus einer zweifachen Wirkung von ATP, die sich teilweise überschneidet, einer pharmakologisch-toxischen Wirkung und seiner Wirkung im Energiehaushalt.

5. Menadion.

Einzelne Versuche wurden unternommen, um die Stoffwechselwirkung des Menadions zu prüfen. Wir stellten dabei fest, dass es in Konzentrationen, die noch nicht toxisch wirkten, keine Leistungssteigerung hervorzurufen vermag. So war es in einer Konzentration von $1,33 \times 10^{-5} \text{ m}$ im Vergleich zur Leistungssteigerung durch Phyllochinon ($1,33 \times 10^{-4} \text{ m}$) ohne jede Wirkung. (siehe Kurve 5) Bei höheren Konzentrationen zeigte es eine ausgesprochen hemmende Wirkung.

6. Hemmstoffe.

In weiteren Versuchen wurde die Wirkung bestimmter als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung bekannter Stoffe wie Dicumarol und Dinitrophenol untersucht. Wir setzten diese Stoffe in steigender molarer Konzentration dem ermüdeten und mit Tocopherol ($1,36 \times 10^{-4} \text{ m}$) Phyllochinon ($1,33 \times 10^{-4} \text{ m}$) und Fructose (0,2 g) wieder erhaltenen Herzen zu und wählten als Kriterium die Konzentration des betreffenden Entkopplers, bei der die erste deutliche Hemmung der Herzleistung feststellbar war.

Hemmstoff	Fructose u. Tocopherol	Fructose u. Phyllochinon	Fructose
Dicumarol	$2,64 \times 10^{-6}$	$4,8 \times 10^{-6}$	1.14×10^{-6}
Dinitrophenol	$5,62 \times 10^{-6}$	$12,5 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-6}$

Molare Konzentration zu Beginn der Hemmwirkung

Wie aus vorstehender Tabelle hervorgeht, ist bei Verwendung von Dicumarol die vierfache molare Konzentration notwendig, um die Leistung des Herzens zu hemmen, wenn dem Organ außer Fruktose noch Vitamin K₁ angeboten wird und die zweifache molare Konzentration, wenn nur Tocopherol dazugegeben wird.

Signifikanz der stat. Versuchsergebnisse.

Zur Berechnung der Signifikanz wurden für ζ und ϵ nach oben angeführter Methode folgende Werte ermittelt:

Versuch 1: Mittlerer Leistungszuwachs aus 40 Vers. nach 120 min:
= 8,98 %, ζ = 5,3, ϵ = 0,838

Versuch 2: mittlerer Leistungszuwachs aus 39 Vers. nach 120 min:
= 23,55 % ζ = 9,0, ϵ = 1,44.

Versuch 3: mittlerer Leistungszuwachs aus 31 Vers. nach 120 min:
= 30,5 % ζ = 10,56, ϵ = 1,9.

Versuch 4: mittlerer Leistungszuwachs aus 19 Vers. nach 120 min:
= 31,45 % ζ = 14,3 ϵ = 3,29.

Werte für die Signifikante K:

	Tocopherol	Phyllochinon	ATP
Fruktose	8,69	9,64	6,59

Die hier angegebenen Differenzwerte liegen laut Berechnung über einem Signifikanzwert von 2,0, sind also statistisch gesichert.

Pharmakologische Wirkung der untersuchten Stoffe

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß es sich bei der Wirkung des Tocopherols und Phyllochinons um pharmakologische Effekte oder Einflüsse auf die Permeabilität im Gewebe handelt, wurden diese Stoffe in einigen Versuchen am unermüdeten, also mit voller Leistungsstärke schlagenden Herzen geprüft. Weder Tocopherol in einer molaren Konzentration von $1,36 \times 10^{-4}$ noch Phyllochinon in einer molaren Konzentration von $1,33 \times 10^{-4}$

zeigte eine Wirkung auf die Kontraktionsstärke in diastolischem oder systolischem Sinn oder auf die Schlagfrequenz.

Menadion dagegen zeigte in einer Konzentration von $1,6 \times 10^{-4} \text{ m}$ einen Effekt im Sinne einer negativ inotropen Wirkung.

ATP hatte schon in einer Konzentration von $2,73 \times 10^{-7} \text{ m}$ deutliche negativ inotrope und dromotrope Wirkung, die weitgehend von der Konzentration abhängig war. Die Amplitude kehrte allerdings sehr bald zur normalen Höhe zurück, stieg je - doch nie über die vorher registrierte Hubhöhe hinaus. ATP hatte also am unermüdeten Herzen keineswegs eine positiv inotrope Wirkung.

Wie aus diesen Befunden hervorgeht, lässt sich die Leistungssteigernde Wirkung der Vitamine E und K sowie ATP nicht auf eine pharmakologische Wirkung zurückführen.

Diskussion.

Sämtliche Arbeiten zum Nachweis einer Coenzymwirkung der Vitamine E und K bei Vorgängen der oxydativen Phosphorylierung wurden an Mitochondrien oder aus Mitochondrien isolierten Enzympräparaten durchgeführt. Selbst bei noch so schonender Durchführung der Präparation werden die Mitochondrien in gewisser Weise geschädigt.

Wie schon erwähnt, ist die oxydative Phosphorylierung in besonderem Masse empfindlich gegen jeden Eingriff in die Struktur. Ursache dürfte eine Desorientierung der vorher geordnet liegenden Enzyme sein.

Um eine spezifische Wirkung der Vitamine nachzuweisen, musste durch mehr oder weniger eingreifende Massnahmen endogen vorhandenes Vitamin entfernt werden.

Martius verwandte Mitochondrien mangelernährter Tiere; Nason und Slater extrahierten ein Enzympräparat mit Iso-Oktan; als

Nason damit nur einen geringen Teil des Tocopherols extrahieren konnte, schickte er der Extraktion eine mehrtägige Behandlung mit mehrmaligem Einfrieren und Auftauen zur Inaktivierung des Tocopherols voraus. Brodie u.a. setzten ihr Präparat ultravioletter Bestrahlung aus, um das Vitamin K zu inaktivieren. Wie weit durch diese Maßnahmen eine Schädigung des Präparates in seiner enzymatischen und morphologischen Struktur erfolgen kann, wird von den Autoren selbst immer wieder diskutiert.

Hier kann mit einiger Berechtigung eine Kritik ansetzen, die die Funktion dieser Vitamine, speziell des Tocopherols, weniger in einer spezifisch enzymatischen als vielmehr in einer strukturbildenden und erhaltenden Wirkung und im Zusammenhang mit Problemen der Zellpermeabilität sehen möchte.

Das ermüdete überlebende Froschherz nach Straub, das zwar in seiner Leistung abgesunken ist, jedoch in seiner Struktur und Funktion weitgehend intakt ist, scheint uns ein besonders günstiges Objekt für Untersuchungen über spezifische Stoffwechselwirkungen der Vitamine E und K zu sein. In unserer Versuchsanordnung ist das Kriterium für diese Wirkung die direkte Messung der Arbeitsleistung des Herzmuskels, die in hohem Masse von der Erhaltung der Struktur abhängig ist und unmittelbar mit Vorgängen des Energiestoffwechsels, d.h. der oxydativen Phosphorylierung, zusammenhängt.

Aus der Tatsache, dass die Arbeitsleistung des isolierten Froschherzens im Laufe der 15-stündigen Durchströmung auf 25 % der normalen Leistung absinkt und durch Zufuhr von Kohlehydrat nur ungenügend wiederhergestellt werden kann, geht hervor, daß durch die Ermüdung der Herzmuskel nicht nur an Substraten, sondern auch in hohem Masse an aktiven Enzymen verarmt sein muß. Dabei muss man sich vor Augen halten, daß das Herz während dieser Zeit ohne jede Zufuhr von Substraten ununterbrochen beträchtliche Arbeit leistet und ausserdem fortwährend durchspült wird.

Wenn es nun gelingt, die Leistung des Organs durch Tocopherol und Phyllochinon in geringen Konzentrationen ($1,33 \times 10^{-4} \text{ m}$ bzw. $1,36 \times 10^{-4} \text{ m}$) um 24 % bzw. 30 % zu steigern, so muß man aufgrund dieser Befunde annehmen, daß durch die experimentelle Ermüdung des überlebenden Organs auch eine Verarmung an Tocopherol und Phyllochinon eingetreten ist und durch Zusatz dieser Stoffe gewisse Vorgänge der oxydativen Phosphorylierung reaktiviert werden, was eine vermehrte Bildung energiereichen Phosphates zur Folge hätte.

Die Tatsache, dass ATP ($2,7 \times 10^{-5} \text{ m}$) die Leistung des ermüdeten Herzens von 20 % auf 60 % der normalen Leistung zu steigern vermag, weist auf einen ATP-Mangelzustand des ermüdeten Herzens hin.

Man könnte das ermüdete Froschherz vielleicht mit dem Vitamin-E-Mangeldystrophischen Muskel vergleichen, in dem ebenfalls - wahrscheinlich durch Hemmung der oxydativen Phosphorylierung - die Bildung von energiereichem Phosphat gestört ist.

Die Annahme einer spezifischen Wirkung der Vitamine E und K_1 am überlebenden Organ konnte weiterhin gestützt werden durch Befunde, die beim Einsatz von Menadion erhoben werden konnten. Menadion ist bei einer Konzentration von $1,33 \times 10^{-5} \text{ m}$ im Vergleich zu Phyllochinon ohne jede Wirkung auf die Organleistung. Bei höherer Konzentration zeigt es eine hemmende Wirkung. Dieser Befund stimmt mit Beobachtungen von Martius überein, die durch direkte Bestimmung der oxydativen Phosphorylierung im Rattenlebermitochondrien gewonnen wurden.

Weiterhin wird die Annahme, daß die Wirkung von Tocopherol und Phyllochinon am Testobjekt auf einer direkten Beeinflussung der oxydativen Phosphorylierung beruht durch Befunde erhärtet, die wir durch Zusatz von Dicumarol und Dinitrophenol erheben konnten. Es zeigte sich, dass bei Verwendung von Dicumarol, das als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung bekannt ist, die vierfache Konzentration notwendig ist, um das

Organ in seiner Leistung zu hemmen, wenn dem Organ ausser Fructose noch Vitamin K_1 angeboten wird und die zweifache Konzentration, wenn ausser Fructose Tocopherol dazugegeben wurde. Diese Befunde lassen sich dahingehend deuten, dass Vitamin E und K gewisse Ferment-Systeme der oxydativen Phosphorylierung reaktivieren, und aus diesem Grunde eine höhere Konzentration der entkoppelnden Stoffe notwendig ist, um eine entsprechende Hemmwirkung im Sinne einer kompetitiven Hemmung zu erzielen.

Zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen:

Die vorliegenden Untersuchungen am überlebenden Organ dokumentieren die hohe spezifische Wirkung der Vitamine E und K_1 , die als Coenzyme in definierte Vorgänge der oxydativen Phosphorylierung eingreifen. Die Verwendung des ermüdeten überlebenden Herzens eröffnet die Möglichkeit auch für Tocopherol faßbare Werte bezüglich seiner Wirkung auf die Atmungskettenphosphorylierung zu erhalten.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Am isolierten überlebenden Froschherzen nach Straub wurde nach Durchströmung und dadurch erfolgter Ermüdung auf durchschnittlich 25 % der Anfangsleistung die Wirkung von α -Tocopherol ($1,33 \times 10^{-4} \text{ m}$) und Phyllochinon ($1,36 \times 10^{-4} \text{ m}$) geprüft. Es ergab sich eine Leistungssteigerung durch Vitamin E um 23,5 % und durch Vitamin K um 29,0 % gegenüber einer Steigerung durch Fructose von 8,9 %.

Menadion hatte keine fördernde Wirkung auf die Organleistung.

In der gleichen Weise wurde ATP ($2,7 \times 10^{-5} \text{ m}$) geprüft, hier ergab sich eine Leistungssteigerung von 31,5 %.

Die Wirkung von Hemmstoffen der oxydativen Phosphorylierung wie Dicumarol und Dinitrophenol wurde untersucht. Zur Erzielung einer Hemmwirkung waren nach Zugabe von Vitamin E oder Vitamin K wesentlich höhere Konzentrationen notwendig als mit Fructose allein.

Die Spezifität der Methode sowie der Wirkung von Vitamin E und Vitamin K in der oxydativen Phosphorylierung wurde diskutiert.

Literatur

- (1) Michaelis und Wollmann Science 109/313 1949
- (2) Boyer J.Am.Chem.Soc. 73/733 1951
- (3) Martius B.Z. 329/449 1957
- (4) Bouman u. Slater Nature 177/1181 1956
- (5) Cowlshaw, S ndergaard, Prange u. Dam BBA 25/644 1957
- (6) Pappenheimer u. Goettsch J.Exp. Med. 53/11 1931
- (7) Mackenzie u. Mc Collin J.Nutrit. 19/345 1940
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 48/642 42..
- (8) Victor Am. J. Physiol. 108/229 1934
- (9) Hummel J. biol.Chem. 172/417 1948
- (10) Weinstock, Milhorat u. Goldrich Arch.of Bioch.57/496 56.
Fed.Proc. 15/577 1957
- (11) Tentori, Toschi u. Vivaldi Boll.Soc.Ital.Biol.Spez.
24/90 1953
- (12) Martius B.Z. 327/407 1956
- (13) Green, S ndergaard u. Dam BBA 19/182 1956
- (14) B. Chance Adv. Enzym. 17/65 1956
- (15) Lehninger Enzymes Units of Biol.Structure and
Function Sympos. 1956
- (16) Martius Hormone und ihre Wirkungsweise 5. Coll.d.
Ges.f.physiol. Chem. 1954
- (17) Martius u. Nitz-Litzow BBA 12/134 1953
- (18) Martius u. Nitz-Litzow BBA 13/152 1954
BBA 13/289 1954
- (19) Martius u. Strufe B.Z. 326/24 1954
- (20) Martius u. Nitz-Litzow B.Z. 326/26 1954
- (21) Martius Ref.Congr.Int.d.Biochem. Bruxelles 1956
- (22) Martius Med.Woch.
- (23) Martius u. Märki B.Z. 329/450 1957
- (24) Martius Kongr.d.Ges.f.Physiol.Chem.Basel
Ref.Angewandte Chemie 3/82 1958
- (25) Cooper u. Lehninger J.biol.Chem. 219/489 1956
- (26) Delvin u. Lehninger J.biol.Chem. 219/507 1956
- (27) Cooper u. Lehninger J.biol.Chem. 219/519 1956
- (28) Wosilait, Nason u. Terell J.biol.Chem. 206/255 1954
- (29) Wosilait u. Nason J.biol.Chem. 208/785 1954

- | | | | |
|------|----------------------------|--|-----------------|
| (30) | Colpa - Boonstra u.Slater | BBA 23/222 | 1957 |
| | | BBA 27/122 | 1958 |
| (31) | Dallam u. Anderson | BBA 25/439 | 1957 |
| (32) | Weber u. Brodie | BBA 25/447 | 1957 |
| | | 25/448 | 1957 |
| (33) | Wessels | Rev.Trav.Chim.Pays-Bas | 73/529 1954 |
| (34) | Arnon | Enzymes, Units of Biol. Structure and Function Sympos. | 1956 |
| (35) | Rabinowitz u. Boyer | J.Biol.Chem. | 192/85 1951 |
| (36) | Nason u. Lehman | Fed.Proc. 14/259 | 1955 |
| | | Science 122/19 | 1955 |
| (37) | Nason u. Lehman | J.Biol.Chem. | 222/500 1956 |
| (38) | Nason, Averbach u. Terrell | J.Biol.Chem. 222/511 | 1956 |
| | | BBA 19/395 | 1956 |
| (39) | Donaldson u. Nason | Proc. Nat. Acad. Sci. | 43/364 1957 |
| (40) | Bücher | Adv. Enzym. | 14/1 1953 |
| (41) | Bouman u. Slater | BBA 26/624 | 1957 |
| (42) | Deul, Slater u. Veldstra | BBA 27/133 | 1958 |
| (43) | Lipman u. Green | Currents Bioch. Research | 1946 |
| (44) | Slater | Ref. Congr. Int. d. Biochem. Bruxelles | 1956 |
| (45) | Scheibe u. Niemer | Zschr. Biol. | 107/294 1954 |
| (46) | Meyer, Jütting u. Schmidt | Mü. Med. Woch. | 98/6 2o2 1956 |
| (47) | Niemer u. Jütting | Klin. Woch. | 34/15/1192 1956 |

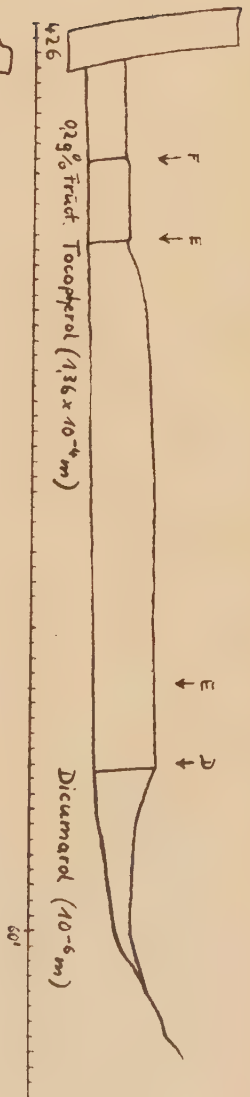
An Literatur wurde ausserdem benutzt:

Stepp-Schroeder-Kühnau Die Vitamine II 1957

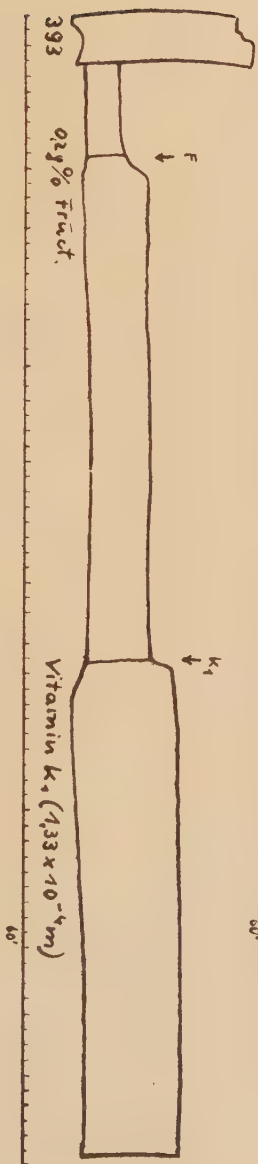
K.Lang: Biochemie der Ernährung 1957

Handbuch der allgemeinen Pathologie, 4. Band II. Teil
Stoffwechsel

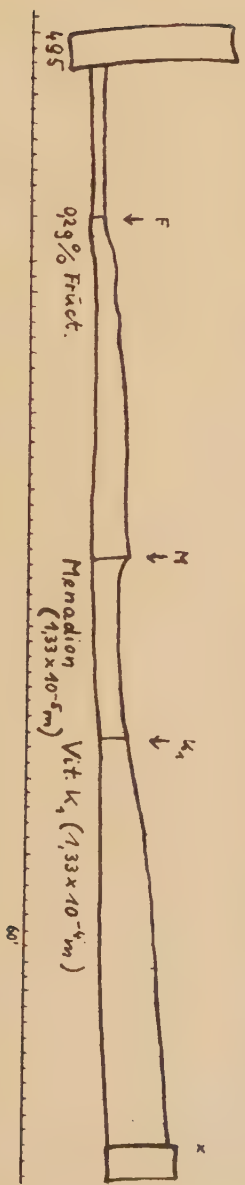
2a



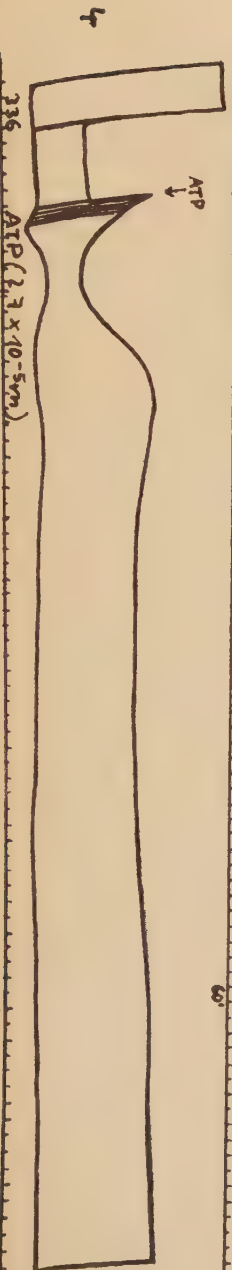
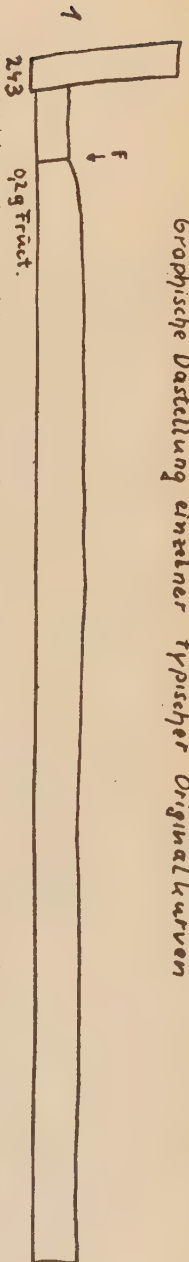
3a



5



Graphische Darstellung einzelner typischer Originalkurven



Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof.Dr. Niemer für die Überlassung des Themas, für die Übernahme des Referates und seine wohlwollende Unterstützung der Arbeit.

Prof. Dr. Butenandt danke ich für die grosszügige Überlassung des Arbeitsplatzes und die Übernahme des Correferates.

Dr. Meyer möchte ich für seinen Rat, seine freundliche Hilfe und die fruchtbare Zusammenarbeit danken.

Lebenslauf

Ich, Peter D o h r n , wurde am 23.1.1934 in München als erstes von vier Kindern des verst.Heilgymnasten Harald Dohrn und seiner Ehegattin Hertha Dohrn geb. Quecke geboren.

Nach vier Jahren Volksschule in Bad Wiessee, wo meine Eltern ein Sanatorium besitzen, besuchte ich von 1944 bis 1945 das Humanistische Gymnasium Paulinum in Tegernsee bis zu dessen Auflösung bei Kriegsende. Von 1946 bis 1950 Internat und Humanistisches Gymnasium der Benediktinerabtei Metten. 1950 bis 1952 besuchte ich das Maximiliansgymnasium in München, wo ich im Juni 1952 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend belegte ich die medizinische Fakultät der Universität München und legte 1955 die ärztliche Vorprüfung ab. 1956 ein Semester in Hamburg.

Von November 1956 bis April 1958 wissenschaftliche Arbeiten unter der Leitung von Prof.Dr.Niemer am Physiolog. chem. Institut der Universität München. Im Herbst 1958 legte ich die medizinische Staatsprüfung ab und arbeite gegenwärtig als Pflichtassistent auf der inneren Abteilung des städtischen Krankenhauses in Bad Reichenhall.

